



TITLE:

Studies on induction of pluripotency in bovine somatic cells and generation of induced pluripotent stem cells(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Kawaguchi, Takamasa

CITATION:

Kawaguchi, Takamasa. Studies on induction of pluripotency in bovine somatic cells and generation of induced pluripotent stem cells. 京都大学, 2016, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2016-05-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19899>

RIGHT:

許諾条件により本文は2017-01-01に公開

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	川口 高正
論文題目	Studies on induction of pluripotency in bovine somatic cells and generation of induced pluripotent stem cells (ウシ体細胞の多能性誘導と人工多能性幹細胞株の樹立に関する研究)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>2007年にヒトにおいて樹立された人工誘導多能性幹細胞(iPS細胞)は、様々な種類の細胞に分化できる能力を持つことから、細胞移植治療などの再生医療への応用が期待されている。一方で、家畜においてiPS細胞は遺伝子資源の保全の観点から、体細胞から個体構築が可能な多能性幹細胞として期待がかけられている。しかし、これまでにマウスおよびヒト以外の動物種においてiPS細胞を樹立したという報告は限られており、特に、個体形成能を持つiPS細胞樹立の報告はマウス以外の動物種では皆無である。その理由として、体細胞のリプログラミングを効率的に誘導するシステムと、リプログラミングを誘導した細胞の多能性を維持する培養条件が適切ではないことが考えられた。</p> <p>本研究では、高度な多能性分化能を示し、個体構築能を持つウシiPS細胞株の樹立を試みた。体細胞として羊膜由来細胞を用い、リプログラミング誘導遺伝子(<i>Oct4</i>、<i>Klf4</i>、<i>Sox2</i>、<i>c-Myc</i>)の導入には、高効率で安定的な遺伝子発現が期待できるpiggyBacベクターを選択した。さらに、このベクターにはドキシサイクリン(Dox)の添加によりリプログラミング誘導遺伝子の発現をコントロールできるシステムを組み込んだ。その結果、Dox存在下ではリプログラミング誘導遺伝子を恒常的に発現させることができ、60回以上の継代が安定的に可能なウシiPS細胞株を得た。しかし、その性質はヒトiPS細胞と類似しており、細胞の分化多能性は限定的であった。そこで、この細胞株を多能性幹細胞の自己複製を亢進・維持することが知られるシグナル伝達系阻害剤を加えた培養条件に移すことにより、マウスiPS細胞や胚性幹細胞(ES細胞)に類似の性質を持つ多能性幹細胞が得られた。この細胞株は、ウシ胚に凝集させることにより、生殖細胞を含む多くの組織に寄与するキメラ個体の形成を可能にした。</p> <p>一般的に、マウスの多能性幹細胞は栄養膜細胞などの胎盤形成に関わる細胞系列には分化できないとされる。本研究で樹立したウシiPS細胞では、多様な分化能を示すと同時に栄養膜細胞様のコロニーの出現も観察された。そのコロニーから樹立された細胞株は、体外で長期的な培養が可能であり、栄養膜細胞に特徴的な遺伝子発現様式を示した。また、Dox非存在下で培養することにより、胎盤形成に関わる細胞系列にも分化が誘導できることから、妊娠初期過程の胚と子宮上皮細胞との相互作用を検討するための体外培養モデルとして有用と考えられた。</p> <p>哺乳動物において、初期胚から派生するすべての細胞系列に分化誘導が可能な細胞株の樹立例はこれまでになく、本研究で得られた細胞株は、分化多能性を獲得するメカニズムの解明や胚の母体認識機構を知るためのモデルとしての応用が期待される。</p>			

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
 審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

多能性幹細胞は、様々な組織や器官に分化する能力を持つことから、再生医療など医療・創薬の研究開発領域で注目を集めている。多能性幹細胞の歴史は古く、特に、1981年にマウスの初期胚からES細胞株が樹立されて以来、多くの動物種で樹立が試みられてきた。しかし、ヒトの場合、ES細胞を樹立する際には、初期胚を破壊して多能性幹細胞を樹立することに対する倫理的問題から、人工的に体細胞に多能性を誘導してiPS細胞を樹立する技術が開発され、再生医療への応用に至っている。同様の技術を用いて、多くの動物種で多能性を有するiPS細胞株樹立の報告がなされているが、そのいずれの細胞株においても、個体の構築と密接に関係する精子や卵子などの生殖細胞に分化しうる高度な多能性を有した細胞株の報告はない。本研究では、ウシにおいて個体構築能を有するiPS細胞株の樹立を試み、以下に挙げる成果を得た。

- 1) ウシ羊膜由来の体細胞にpiggyBacレトロトランスポゾンベクターをキャリアとして、4種類 (*Oct4*、*Klf4*、*Sox2*および*c-Myc*) の多能性誘導遺伝子を導入し、さらに、Doxの添加によりリプログラミング誘導遺伝子の発現をコントロールできるシステムを構築した。
- 2) このシステムによって、2種類の多能性細胞株が作製され、そのうちの一つは従来と同様に多能性を有しながら、生殖細胞には分化できない細胞株であった。もう一つは、マウスのES細胞に類似の形態を持つ細胞株であり、ウシ胚と凝集させることにより、体を構成する主要な組織以外に、生殖細胞へも分化できる能力を有していた。
- 3) 2種類の細胞株は細胞分化に関わるシグナル伝達系阻害剤の有無によって相互に細胞変換が可能であり、多能性幹細胞の樹立に培養液条件の重要性が示された。
- 4) 樹立された多能性幹細胞株をDoxの非存在下で培養することにより、体外での細胞分化誘導が可能であり、特に、マウスのES細胞では困難であった胎盤を構成する胚体外細胞系列への分化誘導が可能になった。着床メカニズムを解明する体外モデルとして利用の可能性を示唆した。

以上のように、本研究は、ウシ体細胞から体のすべての細胞群に分化誘導可能な細胞株の樹立を可能にし、家畜改良、有用遺伝資源および絶滅危惧種の保全、発生生物学、再生医療領域に寄与するところ大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成28年2月8日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）